(19) 日本国特許庁 (JP)

①特許出願公開

^⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—225103

⑤Int. Cl.³
A 01 N 63/00
//(A 01 N 63/00
59/24
37/34

識別記号 庁内整理番号 7144--4H **劉公開** 昭和59年(1984)12月18日

発明の数 3 審査請求 未請求

(全 8 頁)

母2成分系生物破壊物及びその使用方法

願 昭59—96727

47/10 33/12 31/08)

②出 願 昭59(1984)5月16日

優先権主張 ②1983年 5 月17日③米国(US)

31)495437

⑦発 明 者 ダニエル・イー・ピーダーセン アメリカ合衆国ミネソタ州5501

6コテツジ・グローブ・インデ

イアン・ブールバード・エス87 98

①出願人 エコノミックス・ラボラトリー・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国ミネソタ州5510
2セントポール・オズボーン・
ビルデイング(番地無し)

⑩代 理 人 弁理士 鈴江武彦 外2名最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

21)特

2 成分系生物破壊物及びその使用方法 2. 特許請求の範囲

- 1. 分離して包装された2成分系生物破壊物であって、
 - a. 有効量の生物破 敷物質と、
 - b.有効量の多糖体分解酵素とを、

工業用水系統中で併用した時に微生物の成長の 抑制と粘液の抑制とを行うに十分な量を備えて いる2成分系生物破磁物。

- 2. 生物破壊物質が生物破壊チォシアン酸塩ル 点物を含む特許請求の範囲第1項記載の2成分系生物破壊物。
- 3. 生物破壊物質がメチレン・ピス・チオシアナートを含む特許請求の範囲第1項記載の2 成分系生物破壊物。

- 5. 生物破壊物質がジメチルジチオカルバミン酸塩とエチレンピスジチオカルバミン酸2ナトリウムとを含む特許請求の範囲第1項記載の2成分系生物破線物。
- 6. 生物破穀物質が生物破壊四基アンモニウムル 合物を含む特許請求の範囲第1項記載の2 成分系生物破壊物。
- 7. 生物破壞物質が生物破壞クロロフェナート 化 物を含む特許請求の範囲第1項記載の2 成分系生物破壞物。
- 8. 生物破壞物質が生物破壞有機水銀化合物 を含む特許請求の範囲第1項記載の2成分系生物破壞物。
- 9. 多糖体分解酵素はレバン加水分解酵素を含む特許請求の範囲第1項記載の2成分系生物破壊物。
- 10. レバン加水分解酵素は粗製レバン加水分解酵素調製品を含む特許請求の範囲第9項記載の2成分系生物破壊物。
 - 11. 多糖体分解酵素はデキストリン分解酵素

である特許請求の範囲第 1 項記載の 2 成分系生物破壊物。

12. 多糖体分解酵素はアミラーゼを含む特許請求の範囲第1項記載の2成分系生物破壊物。

13. 有効量の生物破壊物質と有効量の多糖体分解酵素とを、実質的に工業用水中で微生物の成長抑制と粘液制御とを行うに十分な量備え、これらを工業用水中に併用する工程を含む2成分系生物破壊物の使用方法。

14. 生物破壞物質が生物破壞チオシアン酸塩ル 6 物である特許請求の範囲第 1 3 項記載の 2 成分系生物破壞物の使用方法。

15. 生物破壊物質が生物破壊チオカルバミン酸塩混合物である特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破壊物の使用方法。

17. 生物破壊物質が生物破壊有機水銀組 台物である特許請求の範囲第13項記載の2成分系

24. 酵素濃度を、工業用水 1000000 部に対し 1 配当り500単位の酵素が少なくとも約2部となるようにしてなる特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破壊物の使用方法。

25. 工業用水は製紙工程の白色水 (white water)を含み、この白色水に処理工程に悪影響を及ぼさない程度の生物破壊物を加える特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破壊物の使用方法。

27. 酵素避度を監視してその有効レベルを維持する特許請求の範囲第26項記載の2成分系生物破壊物の使用方法。

28. 生物破換物質を加える前に、工業用水中に有効量酵素を加える特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破壊物。

29. 2 つの包装された生物破擬付加剤であって、基本的に

生物破壊物の使用方法。

18. 生物破壞物質が生物破壞四基アンモニウム化合物である特許請求の範囲第13項記戦の2成分系生物破壞物の使用方法。

19. 多糖体分解酵素はアミラーセである特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破擦物の使用方法。

20. 多糖体分解酵素はデキストリン分解酵素である特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破譲物の使用方法。

21. 多糖体分解酵素はレイン加水分解酵素である特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破壊物の使用方法。

22. 工業用水の温度が23.9℃~66℃
 (75 F~150 F)である特許請求の範囲第21項記載の2成分系生物破壊物の使用方法。

23. 生物破壞物質の水中濃度を、工薬用水1000000 部に対して生物破壞物質が略1~600部となるように維持してなる特許請求の範囲第13項記載の2成分系生物破壞物の使用方法。

a.レパン加水分解酵素製剤

b.メチレン-ビス-チオシアナートとから なり、

有効量を分離して包装して製紙工程で生ずる日 色水流中の微生物成長を抑制するようにした 2 成分系生物破穀物。

3. 発明の詳細な説明

(発明の分野)

この発明は、2成分系生物破壞物に係り、工業用水中の粘液(slimes)、バクテリア及び 歯類を抑制するに適したものを得んとするものである。

(発明の背景)

現在、水、特に工業用水に存在する粘液,ベクテリア及び菌類が問題となっている。例えば工業用水中に粘液があると、これを冷却塔, 腐液排出物,特定物の運搬などの工業的処理過程において用いた場合、問題が生ずる。特に、ペルプ、 製紙工場で作られた水は、 固有のマイクロフローラととのマイクロフローラで作られた

粘液との影響を受ける。これら粘液は、製造工程において問題となり、ノズルの閉塞、スクリーンの目詰り、孔や変色の如きシートの欠陥などを生ぜしめる。

ここで粘液とは、広い意味で用いられ、粘液質,粘着性及び皮のような材質をも含む。これら材質は、代表的には重合体からなり、又は、 重合体から作られ、通常多種類の微生物から作 られた多糖類排泄物である。

しかしこれら化学薬品は微生物群を有効に抑制 するに必要を添加すると、そのコストが学業 く、しかも舞性が高くなる。更に多くの化学薬 品は、濃度が高い場合でも、アルカリダ知点が もも、でして、サイズとというのではない。 かある。またパクテリア群のサイズと粘液の蓄積 との間には、明確な相関が存在しない。 の数が少ない場合でも、水中に相当量のもない。 の蓄積が見られる。逆に粘液の蓄積があまる。 くとも、水中のパクテリア数が多い場合がある。 従って生物破壊剤を使用しても、生物的粘液の 蓄積を必ずしも適切に抑制することができない。

生物破壊剤の他に、レバン加水分解酵素(レバナーゼ)を使用して、粘液の蓄積をある程度抑制できるととが知られている。レバンは、多種類のバクテリアによって作られる多糖体で、多くの工業的粘液の重要を組成であることが先に見出されている。米国特許系3824184において、ハーバート・ジェイ・ハッチャーは、レバン加水分解酵素を粘液蓄積物又は粘液問題

が潜在する工業用水に加えることを開示している。この酵素は マーヤのレバンを加水分解して、粘液を分解し、水系統に存在する問題を少なくする。しかし酵素は、微生物群を制限し又は減少することはない。

本発明者らは、生物破壊物質と多糖体分解酵素とを併用することにより、微生物数と粘液の蓄積とを、これらを単独で用いた場合よりも、より有効に減少させることができることを見出した。

(発明の詳細な説明)

生物破壞物質

この発明の生物破 蝦物質組成は、原則として 酵素の活性に悪影響を及ぼすもの(以下にのべる)でなければどのようなものでもよい。 適当 な生物破壊物質として、ペンタクロロフェネートやトリクロロフェネートの如き クロロフェネート ート化合物,フェニル水銀酸の如き 有機水 化 合物,メチルシチオカルバミン酸塩, エチレン ピスジチオカルバミン酸塩、及びシメチルシチ 生物破壊物質のうちメチレン・ピス・チオンアナートは、シメチルシシオカーポネートとエチレンピスジチオカルパミン酸2ナトリウムと併用することにより、特に有効であることが立証されている。

生物破壊物質は、多くの化学品供給会社から得られる。例えば、アメリカンシアナミド・ベ

ッツ,ベックマン,ディアポーン・ケミカル, エコノミックスラポラトリー株式会社,メルッ ク,ナルコ,ビネランドケミカル等から得られる。

この発明で有効となりうる生物破穀物質の避能は、水の温度、内、微生物数及び処理する工業用水の種類などの条件によりかなり異なる。所認機度の下限及び上限は、実質的に生物破壊物質の種類又は組合せにより異なる。例えば、生物破壊物質の効率が高ければ工業用水 1000000部に対し約1,2部(ppm)であればよい。一方四基アンモニウム組成物では、最小濃度でも75又は100pm必要とする。ある生物破壊物質では、上限は600pm又はそれ以上に達する。これら先に述べた生物破壊物質についてこの発明での有効な渡度範囲及び製紙過程で有効な好ましい範囲につき、以下に示す。

生物破壊剤 総 囲 好ましい絶囲 メチレン-ピス-チオシアナート 5~30 ppm 15~25 ppm カルパミン酸塩 50~250 ppm 75~125 ppm プロモプロピオンアミド 100~400 ppm 200~300 ppm

するものである。例えば、酵素には、アキストラナーゼ、 a 又は B アミラーゼ、 レバン加水分解酵素製剤等が挙げられる。多くの 微生物は、 細胞外フラクタン多糖体 (レバン)を形成する。 レバン粘液とレバンを作る微生物は、 製紙 で作られる水中にとくに存在して、 ペルプ、 製紙工業に多くの問題を引起とすことが知られている。酵素生成物は、 レバン加水分解酵素又はレバナーゼを含み、粘液又はレバンによる微生

物コーテイングに対して有効である。

酵素は、従来公知の方法、即ち酵素を作る微生物を所定の栄養物中におき、この微生物に所 副の酵素を作らせる方法により、通常得られる。 加水分解酵素を作る微生物は、公知であり、ロ ドトルラ sp・,アゾトパクター sp・,パチルス sp・,アーソパクター sp・,ミクロココス sp・, シュードモナス sp・などがある。レバン加水分 解酵素は、公知の適切な手順と条件を用い、栄 養物のレバンでとれらを作ることにより、これ 5生物中で典型的に作られる。レバン加水分解 所定の濃度が有効であるかどりかは、多くの 因子による。例えば、条件,特別の工業過程・ システムにおける有機物の負荷、機械消浄度、 生物破壊剤の種類又は混合組合せにより異なる。

西华 禁

この発明の酵素成分は、任意の有効な多糖体分解酵素又は多糖体分解酵素(palysaccharidass)とすることができる。酵素は、多糖体に起因する水系統の問題に関連して、適宜選択される。例えば各種酸粉成分、グリコーゲン成分、アキストラン成分、レベン成分等があると、これらは工業用水に好ましくない影響を与える。酵素は、これら特定の多糖体のいずれかを有するシステムに加えられて、特定の多糖体を加水分解

酵素を作る1 つの方法は、米国特許 M3773623 に開示されている。また別の方法が米国特許 M2 6 7 3 8 2 8 に開示されている。

酵素の製造に用いるレバン、デキストラン等の所選栄養物を作る方法は、いくつか知られている。とれらを作る方法は、米国特許 K3033758, K2673828及び K3391061 に開示されて

との発明の酵素成分は、全てのセル培養物 (酵素粗製物)を含むことができ、酵素化合物 自体、酵素を作る微生物及び各種発酵製品など が含まれる。また酵素成分には、例えば分留に よって得られた精製酵素を含むことができる。 安定化剤として、亜硫酸ナトリウムや他の選元 剤、細胞質蛋白質、及びプロピレングリコール や他の有効なポリアルコールの如きものも、従 来公知であるが選ましい。

使用方法

工業用水の処理において、まず除業成分を加 えてシステム中に多糖体の分解をはじめるのが 好ましい。酵素成分は公知の方法で加えて、水中に所盛の酵素凝废とすることができる。この発明で特に好適な結果を得る酵素凝废は、工業用水 1000000 部に対し、1 ml 当り500単位の酵素を少なくとも約2部加えた濃度、あるいは工業用水1ガロンに対しレバン加水分解酵素を4単位加えた濃度である。

特に酸素を工業用水に間欠的に加えるのが好ましい。システムの水流特性に関して適当な添加時期を測定して、所定時期に酸素を供給するのが好ましい。公知の方法で酵素添加速度を監視し、所塾のレベルに維持する。酵素が多く加えられすぎれば、多糖体洗酸物は、分解する前に流出する。とれら洗酸物は、システムの閉塞、紙製品の破損等をひきおとすため、工業的処理過程で問題となる。

工業用水の温度は、酵素の活性に影響を与える。従って好ましい水温は、生物破壊物質が少くても酵素が粘液や微生物数を減少させるに十分な活性をもたらすことができる温度である。

とくにレバン加水分解酵素では、急速な加水分解をおこすに必要な温度は 2 3.9 ℃~6 6 ℃ (75 F~1 5 0 F)であり、とくに好ましくは3 2.2 ℃~5 7 ℃ (9 0 F~1 3 5 F)であ

一般に酵素は、酵素粗製品として、液状あるいは55ガロン包みのパッケージとして売られている。むろん酵素粗製品は、例えば1ポンド当り所定の酵素活性単位を有する乾燥品であってもよく、この場合酵素又は酵素粗製品は蛋白質の如き溶解しない蒸質上に乾燥させられている。

処理水では、システムに加える他の適切な方 法が用いられるとしても、生物破凝物質のスト ックをゆっくり供給するのが好ましい。しかし、 生物破壊物質を連続的に供給すれば、微生物が 過度に成長して、生物破壊物質に耐性を持つこ ととなる。

一般に生物破壊成分は、 楽局でカートン又は 他のペッケージとして、各種濃度の被状又は乾

燥形状として売られている。

実施例【

6個の250ml 重複撹拌フラスコにそれぞれ50ml デフコ栄養業肉汁培養基を供給した。媒質はアエロベクターレバニカムの斜面(slant)から接種した。フラスコを1時間、30℃で撹拌し、微生物の成長をうながした。次いでフラスコを30℃で48時間(潜伏期間)放低した。 潜伏期間後、フラスコを簡単に搅拌しした。 潜伏期間後、フラスコを簡単に搅拌した。 常1 表に示すように 6 個中 4 個のフラスコに対し、1 ml 当り500単位の機 底を持つ解案に対いた。レバン加水分解酵素活性の1単位はレバン 選 質から1分当り果糖を0.35 μ8 形成する液

体又は粉末の所定量である。次いで全てのフラスコを約150 rpm の回転振動機で光時間、30 c で攪拌した。更に第1表に示すように6個のうち4個のフラスコにメチレン・ピスーチオシアネートを所定量加える。次いでフラスコを再度攪拌器に4時間置き、平板数を数える。その結果は、次の如きである。

第 1 表

| メチレンーピスー チオシアネート (ppm) | レパン加水分解酵素を 有する完全細胞培養 (ppm) | コロニー形成単位 |
|------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| 3 5 | 0 | 3.6 × 1 0 ⁴ |
| 3 5 | 2 1 | 2.8×10^{2} |
| 4 0 | 0 | 2.5×10^{4} |
| 4 0 | 2 1 | 1.8×10^{1} |
| 0 | 2 1 | 2.2 × 1 0 9 |
| 0 | 0 | 9.7×10^{8} |

おどろくことに、生物破壊物質とレバン加水 分解酵素とを組合せることにより、完全細胞培 發中で生物破壊物質単独の効果とレバン加水分 解酵素の効果とを単純に加えた予想される結果 よりも実質的により少ないコロニーしか形成さ れなかった。

與 施 例 Ⅱ ~ Ⅵ

全細胞培養を所定量加えた。とれらフラスコを 150 rpm の回転批拌機で30℃、 %時間批拌 した。表に示すよりに、2つのフラスコ(一方 は全細胞培養で処理されたものである)に所定 の生物破壊物質を所定量加えた。4つのフラス コ全てを回転撹拌機に置いて5分混合した。次 いで静止培養基として約2%時間潜伏せしめた。 標準プレート数は4つのフラスコの内容物全で が取られた。プレート数は30℃で潜伏から 48~72時間後に配まれた。結果は次の通り である。

実 施 例 [

メチレン-ピスーチオシアナート (MBT) 及び レパン加水分解酵素 (LH) を含む完全細胞培養: アエロパクターレパニカムの生育力に関する効 果。

| MBT | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|---------------------|
| 2 0 ppm | 0 | 1.4 × 1 0 9 |
| 20 ppm | 4 0 ppm | 1.2 × 1 06 |
| 0 ррш | 4 0 ppm | 6.9×10^{9} |
| 0 ppm | 0 ppm | 4.3×10^{9} |

実施例Ⅲ

メチレン・ピス・チォシアナート (MBT) 及びレバン加水分解酵素 (LH) を含む完全細胞培養:ロドトルラグルチニスの生育力に関する効果。

| мвт | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|------------------------|
| 1 0 ppm | 0 ppm | 4.7 × 1 0 ⁴ |
| 1 0 ppm | 4 0 ppm | 9.0×10^{1} |
| O ppm | 4 0 ppm | 4.6×10^{8} |
| 0 ррт | O ppm | 3.0×10^{8} |

奥施例 N

メチレン・ピス・キオシアナート及びレバン 加水分解酵素 (LH) を含む全細胞培養: バチル スサプチリスの生育力に関する効果。

| MBT | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|---------------------|
| 20 ppm | 0 ррт | 1.6×10^{4} |
| 2 0 ppm | 4 0 ppm | 2.0×10^{5} |
| O ppm | 4 0 ppm | 5.6×10^7 |
| () ppm | 0 ppm | 1.2×10^7 |

実施例V

シメチルシチオカルペミン酸塩(13%)、エ

チレン・ピスジチオカルバミン酸 2 ナトリウム 及びレバン加水分解酵素 (LH) を含む完全細胞培養: アエロバクターレバニカムの生育力に関する効果。

| カルパミン酸塩 | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|--------------------|
| 200 ppm | 0 ppm | 6.0×10^5 |
| 200 ppm | 4 0 ppm | 4.0×10^2 |
| 0 ррт | 4 0 ppm | 8.4 × 1 0 9 |
| maa O | O npm | 63×10 ⁹ |

実施例 VI

ジメチルジャオカンバミン酸塩(13%)、エチレンピスジャオカルバミン酸塩(15%)及びレバン加水分解酵素(LH)を含む完全細胞培養:ロドトルラグルチニスの生育力に関する効果。

| カルバミン酸塩 | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|------------------------|
| 100 ppm | O ppm | 4.1 × 1 0 6 |
| 100 ppm | 4 0 ррт | 6.0×10^{5} |
| 0 ррт | 4 0 ррт | 8.4 × 1 0 ⁷ |
| 0 ppm | Оррт | 2.1×10^{7} |

実施例 VI

ジメチルジケオカルバミン酸塩(13%)、エチレンピスジケオカルバミン酸塩(15%)及びレバン加水分解酵素(LH)を含む完全細胞培養:
バチラスサプチリスの生育力に関する効果。

| カルバミン酸塩 | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|------------------------|
| 100 ppm | 0 ppm | 1.0×10^{5} |
| 100 ppm | 4 0 ppm | 5.0×10^{1} |
| 0 ррт | 4 0 ppm | 8.9×10^7 |
| 0 ppm | 0 ррт | 1.2 × 1 0 ⁷ |

実施例 I ~ V によれば、生物破壊物質とレベン加水分解酵素を含む完全細胞培養とを併用したもので処理された成長媒体中に存在するコロニー形成単位が、生物破壊物質単独・レベン加水分解酵素単独あるいは処理しないものに比べて著しく少ない。

実施例WI~ K

各実施例では、 4 個の重複した 2 5 0 ml 撹拌 フラスコに 5 0 ml デフコ栄養素肉汁媒質を含有 せしめ、0.5 重量 8 サッカロースをスファエロチラスの培養 基斜面から接種した。次いでフラスコに加えて手で撹拌し、全俗解物 1 0 0 8 当りレバン5 8 を含むレバン溶解物を 5 重量 8 加えた。細胞は 2 4 時間、室温で啓伏せしめた。 潜伏期間後、レバン加水分解酵素(500単位/nb)を含む完全細胞培養を所定量加え、ゆっくりと手で撹拌した。 2 時間後、生物破験物質をフラスコに所定量加えた。混合物を室温に放躍した。2 時間後生存細胞のプレート数をかぞえた。その結果を表に示す。

実施例 WI

メチレン・ピス・キオシアナート (MBT) 及びレバン加水分解酵素 (LH) を含む完全細胞培養:スファエロチラスの生育力に関する効果。

| MBT | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|------------------------|
| 1 0 ppm | 0 ppm | 5.3×10^4 |
| 1 0 ppm | 4 0 ppm | 4.7×10^{5} |
| 0 ppm | 4 0 ppm | 9.8 × 1 0 ⁷ |
| Оррт | 0 ррт | 8.6 × 1 0 6 |

実施例 K

ジメチルジ 4オカルバミン塩ナトリウム (DTC) 及びレバン加水分解酵素 (LH) を含む完全 細胞培養:スファエロチラスの生育力に関する効果。

| DTC | LH | コロニー形成単位 |
|---------|---------|---------------------|
| 100 ppm | 0 ppm | 4.5×10^4 |
| 100 ppm | 4 0 ppm | 6.8×10^{5} |
| 0 ррт | 40 ppm | 5.3×10^7 |
| 0 ррт | 0 ррт | 2.0×10^{7} |

試験結果によれば、生物破壞物質及びレバン加水分解酵素とを含む全細胞培養器を併用したものは、生物破壊剤単独・レバン加水分解酵素単独あるいは処理しないものに比べ、スファエロチラスに対して著しく効果がある。

本発明は、いかなる理論にも制限されるものではないが、本発明者の研究によればレバンの 如き多糖体を分泌する多くのバクテリアは、 細胞表面をおおりカプセルに入った多糖体層を発

現するととがわかった。この多糖体層は、バクテリアを生物破壊物質の作用から保護する。他の数生物は、多糖体製造バクテリアを含む媒質中に存在して、同様の保護層でおおわれる傾向にあり、これは多分多糖体の多くが溶解性を多するためとおもわれる。従って他の微生物を多糖体製造バクテリアに加えると生物破壊物質に対して耐性を持つようになる。

発明者らは、更に適切な酵素は、保護層を分解又は破壊でき、生物破壊物質の効率を著しく高め、生物破壊物質が少なくとも微生物数を満足できるレベルまで減少できることを見出した。 同時に酵素は、粘液に作用し多糖体成分を加水分解することも見出した。

以上の説明及び実施例により、この発明の詳 細が明確になる。しかし、この発明の範囲から 外れることがなければ、実施例に限定されず他 のどのようなものでもよいことは勿論である。

出願人代理人 弁理士 鈴 江 武 彦

第1頁の続き

⑩発 明 者 ハーバート・ジエイ・ハツチヤ

_

アメリカ合衆国ミネソタ州5512 2イーガン・ヒツコリー・ヒル ・エス1742